



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN



F1000107808B

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 107808 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

15.10.2001

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12Q 1/37, G01N 33/573

(21) Patentihakemus - Patentansökning

19991836

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

31.08.1999

(24) Alkupäivä - Löpdag

31.08.1999

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

01.03.2001

(73) Haltija - Innehavare

1 •Biohit Oyj, Laippatie 1, 00880 Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Sipponen, Pentti, Käärnesaarentie 4 A, 02160 Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)

2 •Härkönen, Matti, Harjuviita 14 C 24, 02100 Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)

3 •Suovaniemi, Osmo, Kulopolku 6, 00570 Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab
Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä verisuoni- sekä syöpäsairaudelle riskialttiin yksilön identifioimiseksi
Förfarande för att identifiera en individ med risk för blodkärls- samt cancersjukdom

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US A 5985540 (C12Q 1/00), US A 5631127 (C12Q 1/00), WO A 96/15456 (G01N 33/74),
Medline An: 1998358827, tiivistelmä artikkelista: Journal of Rheumatology, 25 (5) 1998, p. 859-863, Drugs and Aging, 12 (4), 1998,
p. 277-292, Journal of Internal Medicine, 244 (4), 1998, p. 341-349, Medical Hypotheses, 49 (4), 1997, p. 289-292, International
Journal for Vitamin and Nutrition Research, vol. 69, 1999 May, nro 3, p. 228-233

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää ja testipakkausta verisuonisairaudelle ja syövälle riskialttiin yksilön identifioimiseksi, menetelmän käsit-
täessä vaiheet, joissa määritetään kvantitatiivisesti pepsinogeeni I:n (PGI) analyttikonsentraatiot mainitun yksilön seeruminäyt-
teessä, määritetään menetelmäspesifinen cut-off-arvo mainitulle analytille, verrataan näin määritettyä analyttikonsentraatiota
analyttin menetelmäspesifiseen cut-off-arvoon ja määritetään homokysteiniinikonsentraatio yksilön seeruminäytteessä.

Denna uppfinning avser ett förfarande och en testförpackning för att identifiera en individ som riskerar utveckla blodkärlsjukdom
och cancer, vilket förfarande omfattar stegen, i vilka man bestämmer kvantitativt pepsinogen I (PGI) analytkoncentrationen i ett
serumprov från nämnda individ, bestämmer ett metod-specifikt cut-off-värde för nämnda analyt, jämför den så bestämda analyt-
koncentrationen med analytens metod-specifika cut-off-värde, och bestämmer homokysteinkoncentrationen i ett serumprov från
individens.

Menetelmä verisuoni- ja syöpäsairaudelle riskialttiin yksilön identifioimiseksi

Keksintö koskee diagnostista yhdistelmämenetelmää sepelvaltimo- ja verisuoni- sekä myös syöpäsairauksille alttiiden yksilöiden identifioimiseksi.

5

Keksinnön mukainen menetelmä perustuu kahden testin yhdistelmään, jotka testit suoritetaan veri- tai seeruminäytteellä yksilöiden identifioimiseksi, joille on taipumus kehittyä tai joilla osoitetaan olevan homokysteiniin kohonneet pitoisuudet ja joille siten on alttius kehittyä tällaisista kohonneista pitoisuuksista johtuvia sairauksia, kuten sydän- tai aivoverisuonisairaus, mukaan lukien valtimon haurauskovetustauti ja iskeeminen halvaus, sekä syöpäsairaudet.

10

Monet erilaiset gastriset sairaudet tai tilat, kuten krooninen atrofisen gastriitti, pernisiöösi anemia, mahahaava, gastrinen polyypitauti ja Ménétrierin tauti (jättiläishypertrofinen gastriitti) edeltävät mahasyöpää. Limakalvon selvästi identifioitavia muutoksia ovat dysplasia ja adenooma. On arveltu, että melkein kaikissa sairauksissa alttius välittyy kroonisen atrofisen gastriitin kautta.

15

Krooninen gastriitti merkitsee mahan limakalvon pitkittyntä tulehdustilaa. Sairaus voidaan karkeasti jakaa superfisiaaliseen ja atrofiseen muotoon. Superfisiaalisessa gastriitissa inflammatorinen soluinfiltraatio konsentroituu pintaepiteelin alle. Kun tulehdus etenee ja diffundoituu spesifisten gastristen eritysrauhasten väliin, on kyseessä krooninen atrofisen gastriitti. Tällöin metaplastiset muutokset korvaavat ainakin osittain mahan limakalvon normaalit rauhasrakenteet.

20



25

Potilailla, jotka kärsivät atrofisesta gastriitista mahan korpus-alueella, on mahasyövän suhteellisen riskin arvioitu, laskettuna suomalaisista syöpätalastoista, olevan noin 4- - 5-kertainen verrattuna henkilöihin, joilla on terve limakalvo.

30

Lisäksi on olemassa riski sairastua pernisiöösiin anemiaan, joka johtuu intrinsic-teki­jän puutoksesta ja B12-vitamiinin imeytymishäiriöstä. Antrum-alueen vaikeassa atrofiassa riski on jopa 18-kertainen. Jos atrofisia muutoksia esiintyy sekä antrum-että korpus-alueella (pangastriitti), riski voi kasvaa jopa 90-kertaiseksi.



Julkaisussa WO 96/15456 esitetään menetelmä mahasyövän riskin seulomiseksi, jonka menetelmän mukaan atrofia joko korpus- tai antrum-alueen tai molempien limakalvossa osoitetaan määrittämällä pepsinogeeni I:n (PGI) ja gastriini-17:n (G-17) analyyttipitoisuudet seeruminäytteessä ja vertaamalla näin määritettyjä pitoi-
 5 suuksia vastaavan analyytin menetelmäspesifiseen cut-off-arvoon. Määritettyjä pitoisuuksia verrataan edullisesti myös vastaavan analyytin menetelmäspesifiseen viitearvoon.

Seerumin PGI-arvo, joka on alle PGI:n spesifisen cut-off-arvon, on osoitus
 10 atrofisesta gastriitista mahan korpus-alueella. Jos seerumin G-17-konsentraatio on alle sen cut-off-arvon, atrofia sijaitsee mahan antrum-alueella. Pangastriitissa seerumin PGI on alle cut-off-arvon ja seerumin G-17-arvo on sen viitearvon alemmalla rajalla.

15 Metyleenitetrahydrofolaattireduktaasi (MTHFR) on solunsisäinen entsyymi, jota tarvitaan homokysteiniin uudelleenmetyloimiseksi metioniiniksi. Tämän entsyymin heikentynyt toiminta johtuu MTHFR-geenin rakenteessa esiintyvistä puutteista tai mm. folaatin, B6-vitamiinin ja/tai B12-vitamiinin ravintopuutoksista. MTHFR-entsyymin heikentynyt toiminta johtaa homokysteiniin seerumi/plasmapitoisuuden kohoamiseen (homokystenemia) ja homokystinuriaan. Homokysteiniin kohonneiden
 20 seerumi/plasmapitoisuuksien on monissa tutkimuksissa osoitettu liittyvän erilaisten sydän- ja verisuonisairauksien kohonneeseen riskiin, homokysteiniin korkean seerumi/plasmapitoisuuden, joka on yli viitearvon, ollessa sydän- ja verisuonisairauden ja iskeemisen halvauksen vakava riippumaton riskitekijä.¹⁻⁵

25 Homokysteiniin aterogeenisen vaikutuksen on ajateltu perustuvan reaktiivisten happilajien kohonneeseen tuotantoon, mikä mahdollistaa lipidiperoksidaation. Riittävä B12-vitamiinitarjonta on välttämätön folaattimetabolialle ja normaalille verituotannolle, sekä hermosolujen toiminnalle. B12-vitamiini muodostaa kompleksin proteiinin, intrinsic-tekijän, kanssa, jonka mahan korpus-alueen limakalvo
 30 muodostaa ja joka kompleksi resorboituu sykkyräsuolen alemmassa osassa. Tämä

on B12-vitamiinin edullisin resorptiomuoto.

Intrinsic-tekijän puutos, joka johtuu atrofisesta gastriitista tai mahasyövästä, erityisesti mahan korpus-alueella, johtaa lopulta B12-vitamiinin puutokseen kehossa ja siten homokysteiinikonsentraation kohoamiseen. Olisi siten erityisen arvokasta 5 identifioida ne yksilöt, joilla on tai joilla on suuri riski saada atrofisesta gastriitista johtuva B12-vitamiinin puutos ja joilla tästä syystä saattaisi olla homokysteiinin kohonnut seerumi- tai plasmapitoisuus. Näillä henkilöillä B12-vitamiinin lisäannostuksen varhaisesta aloittamista olisi hyötyä verisuonisairauksien ehkäisemisessä. 10 Olisi myös arvokasta kyetä identifioimaan ne yksilöt, joilla olisi solunsisäisten happiradikaalien ylituotannosta johtuva syöpäriski, ja joille olisi etua B12-vitamiinin lisäannostuksesta tai muusta hoidosta.

Keksinnön kohteena on menetelmä, jossa seeruminäytteestä tehtävä atrofisen 15 gastriitin markkerin määrittäminen yhdistetään homokysteiinikokeeseen, yksilön verisuoni- sekä syöpäsairauksien diagnoosin edesauttamiseksi, tai näiden riskin arvioimiseksi, jolloin termin verisuoni on ymmärrettävä laajasti käsittävän minkä tahansa sydän- tai verisuonisairauden, joka voi johtua homokysteiinin aterogeenisistä vaikutuksista.

20

25

30

35

40

45

50

55

Keksinnön mukainen menetelmä on menetelmä verisuoni- ja syöpäsairaudelle riskialttiin yksilön identifioimiseksi, menetelmän käsittäessä vaiheet, joissa

- määritetään kvantitatiivisesti pepsinogeeni I:n (PGI) analyyttikonsentraatiot mainitun yksilön seeruminäytteessä

- määritetään menetelmäspesifinen cut-off-arvo mainitulle analyyttille

- verrataan näin määritettyä analyyttikonsentraatiota analyytin menetelmäspesifiseen cut-off-arvoon, ja

- määritetään homokysteiinikonsentraatio yksilön seeruminäytteessä ja verrataan sitä homokysteiinin menetelmäspesifiseen viitearvoon.

Seerumin PGI- ja homokysteiinikonsentraatioiden määrittäminen voi tapahtua missä

tahansa järjestyksessä, jotta saadaan samanaikaisesti tietoa sekä seerumin PGI- että homokysteiinipitoisuuksista, jonka tiedon tarkoituksena on olla avuksi verisuonisairauden tai syövän diagnostisoinnissa tai riskin arvioimisessa. Kuitenkin keksinnön erään suoritusmuodon mukaisesti määritetään seerumin PGI-konsentraatio ja sitä verrataan sen määritettyyn tai valittuun menetelmäspesifiseen cut-off-arvoon sekä määritetään homokysteiinipitoisuus kun seerumin PGI-konsentraatioarvo on alle sen menetelmäspesifisen cut-off-arvon. Tässä suoritusmuodossa homokysteiinimääritys suoritetaan yksilöille, joille on määritetty alhaiset seerumin PGI-arvot, osoituksena korpus-atrofiasta.

10

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaisesti määritetään myös mainitun yksilön seerumin B12-konsentraatio ja sitä verrataan B12-vitamiinin menetelmäspesifiseen viitearvoon.

15

Näin ollen edullisen suoritusmuodon mukaan keksinnön tarkoituksena on erityisesti seuloa sellaiset yksilöt, joilla ei vielä ole B12-vitamiinin puutosta, toisin sanoen joilla on olennaisesti normaalit B12-vitamiinipitoisuudet mutta joilla, johtuen alhaisista PGI-arvoista, on diagnostisoitu mahan korpus-alueen atrofia ja joilla on myös seerumin korkeat homokysteiinipitoisuudet. Tällainen identifiointi mahdollistaa jo aikaisessa vaiheessa turvautumisen ennalta ehkäiseviin toimenpiteisiin, esimerkiksi B12-vitamiinin lisäannostukseen, kohonneisiin homokysteiinipitoisuuksiin liittyvien vaurioiden kehittymisen estämiseksi.

20

1. Pepsinogeeni I:n (PGI) määrittäminen

25

Menetelmä PGI:n määrittämiseksi seeruminäytteessä voidaan suorittaa julkaisussa WO 96/15456 esitetyllä tavalla, joka julkaisu liitetään tähän viitteenä.

30

Mainittu menetelmä sisältää edullisesti pepsinogeeni I:n poly- tai monoklonaalisten vasta-aineiden käytön immunologisessa menetelmässä pepsinogeeni I:n määrittämiseksi. Reaktio suoritetaan edullisesti sopivalla kantajalla, kuten muovi-, lasi- tai

selluloosakantajalla, esimerkiksi mikrolevyllä. Immunologiset menetelmät voidaan suorittaa tunnetulla tavalla käyttäen esim. absorbanssi-, luminesenssi- tai fluo- resenssitekniikoita mainitun pepsinogeeni I-konsentraation mittaamiseksi näytteessä.

- 5 Jos seerumin pepsinogeeni I-konsentraatio on alle cut-off-arvon, joka, riippuen kyseessä olevan menetelmän spesifisyydestä ja sensitiivisyydestä, on 20-30 $\mu\text{g/l}$, joka vastaa noin 450-690 pmoolia/l, kyseessä on atrofia mahan korpus-alueella. Normaali- tai viitearvo PGI:lle on alueella 25-120 $\mu\text{g/l}$.

10 2. Homokysteiinin määrittäminen

Homokysteiinipitoisuudet seerumissa voidaan määrittää minkä tahansa, tähän tarkoitukseen tunnetun menetelmän mukaan, jotka menetelmät ovat myös kauppalisesti saatavissa olevia, esim. testipakkauksen muodossa. Tunnettu menetelmä

- 15 kokonaishomokysteiinin kvantitatiiviseksi määrittämiseksi plasmassa tai seerumissa on korkean erotuskyvyn nestekromatografia, jossa on radioaktiivinen, fluoresoiva tai elektrokemiallinen detektio. Myös entsyymi-immunokoemenetelmä (EIA) on kehitetty (Bio-Rad Laboratories; Axis-Shield A/S) samoin fluo- resenssipolarisaatioimmunokoe (FPIA; Abbot Laboratories), joka immunokoe sisältää näytteiden esikäsittelyn ditiotreitolilla ja adenosiinilla, jonka jälkeen seuraa entsymaattinen vaihe S-adenosyyli-L-homokysteiinin muodostamiseksi, ja kokonais- homokysteiini mitataan esim. käyttäen monoklonaalisia anti-S-adenosyyli-L-homokysteiinivasta-aineita, katso esim. US 5,631,127.

- 25 Homokysteiinin viitearvot ovat jossain määrin menetelmäspesifisiä, mutta yleensä ne vaihtelevat välillä noin 5-15 $\mu\text{moolia/l}$. Seerumin homokysteiinipitoisuus, joka on homokysteiinin menetelmäspesifisen viitetason yläpuolella, muodostaa riskin, kuten edellä esitettiin. Homokysteiinipitoisuus, joka on yli 15 $\mu\text{moolia/l}$, voidaan useimmissa tapauksissa arvioida niin korkeaksi pitoisuudeksi, että se muodostaa selvän riskitekijän.
- 30

3. B12-vitamiinin määrittäminen

Keksinnön mukaan diagnoosimenetelmä käsittää seeruminäytteen B12-vitamiinikonsentraation vaihtoehtoisen määrittämenetelmän. B12-vitamiinin (kobalamiini) konsentraatio voidaan määrittää minkä tahansa, tähän tarkoitukseen tunnetun menetelmän mukaan. Tällaisia tunnettuja menetelmiä ovat seerumin B12:n mikrobiologinen koe, jossa käytetään organismia, kuten *Euglena gracilista* tai *Lactobacillus leichmannii*, joka vaatii kobalamiinia kasvaakseen. Myös B12-vitamiinin radioisotooppisia laimennuskokeita on käytetty ja tällaiset koetekniikat on hyvin esitetty kirjallisuudessa, esim. Lau *et al.*, "Measurement of serum B12 levels using Radioisotope Dilution and Coated Charcoal", *Blood*, 26 (1965), 202. Radioisotooppilaimennusmenetelmät ovat nopeampia ja antavat tulokset, jotka ovat vertailukelpoisia esim. *Euglena*-kokeella saatuihin tuloksiin, edellyttäen, että sidospoteiini on spesifinen biologisesti aktiiviselle kobalamiinille. Standardisoitu puhdas tai puhdistettu intrinsic-tekijän valmiste on kaikkein tyydyttävien sidospoteiinina, koska se sitoutuu spesifisesti todelliseen kobalamiiniin mieluummin kuin kobalamiinianalogeihin.

B12:n radioisotooppilaimennuskoe sisältää yleensä vaiheen, jossa endogeeninen B12 vapautetaan sen luonnollisesta sidospoteiinista, esim. keittämällä valitussa pH:ssa, jonka jälkeen lisätään mitattu määrä radioisotooppia ^{57}Co -B12 ja rajoitettu määrä sidospoteiinia. Kaikki sidospoteiini tulee sidottua jollain B12-muodolla, koska lisätyn radioisotoopin B12 määrä on riittävä sitomaan pienen määrän proteiinia. Koska sekä luonnollinen että radioaktiivinen B12 kilpailevat sitoutumisesta sidospoteiiniin, aste, johon proteiinisidotun B12:n radioaktiivinen määrä inhiboituu, on osoitus B12:n määrästä näytteessä. Tätä menetelmää on muuntanut Lau, *supra*, erottamalla sitoutumaton B12 proteiiniin sitoutuneesta B12:sta proteiiniinipäällysteillä aktiivihieillä ja supernatanttineesteeseen, joka sisältää sitoutuneen radioaktiivisen B12:n ja sitoutuneen ei-radioaktiivisen B12:n seoksen, radioaktiivisuus lasketaan. Sen jälkeen seerumin B12-konsentraatio lasketaan saadusta tuloksesta, usein vertaamalla standarditaulukkoon. Radiotestipakkauksia on kaupallisesti saatavissa

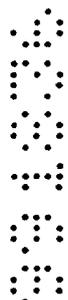
menetelmän suorittamiseksi.

B12-vitamiinin puutos on myös määritetty käyttäen esim. kemiluminisenssi-
reseptorikokeita (Wentworth, S. *et al.*, Clin.Chem., Vol 40, 537-549), radioim-
munokokeita (Enders, D.B., *et al.*, Clin.Chem., Vol. 24, 460-465) sekä myös ei-
5 isotooppisia sitoutumiskokeita, CEDIA, kloonatun entsyymidonorin immunokokeita
(van der Weide, J. *et al.*, Clin.Chem., Vol 38, 766-768).

Viitearvo B12:lle vaihtelee välillä 200-900 ng/l, vastaten noin 170-700 pmoolia/l.

10

Äskettäin tehdyssä, julkaisemattomassa työssämme havaitsimme, että 50 % niistä
potilaista, jotka kärsivät korpus-atrofiasta (S-PGI < 25 µg/l) ja joiden seerumin B12-
vitamiinikonsentraatio oli alle viitearvon alemman rajan (< 170 pmoolia/l), oli
merkittävästi kohonnut seerumin homokysteiinikonsentraatio (keskiarvo 33,3
15 µmoolia/l, 16-157 µmoolia/l). Lisäksi 22 % niistä potilaista, joilla seerumin B12-
vitamiinikonsentraatio oli välillä 180-230 pmoolia/l (viitearvot 170-700 pmoolia/l),
oli myös kohonnut homokysteiinikonsentraatio (keskiarvo 18,9 µmoolia/l, 16-25
µmoolia/l).



20

Keksintö koskee myös testipakkausta käytettäväksi keksinnön mukaisessa menetel-
mässä, joka testipakkaus sisältää

- välineet PGI-konsentraation määrittämiseksi seeruminäytteessä,
- välineet homokysteiinikonsentraation määrittämiseksi seeruminäytteessä.

25

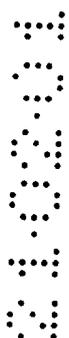
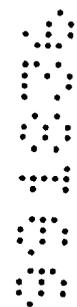
Keksinnön mukainen testipakkaus voi sisältää yhdistelmän, joka muodostuu niistä
yksittäisistä komponenteista, joita tarvitaan määrittäessä kvantitatiivisesti seerumin
pepsinogeeni I- ja homokysteiinikonsentraatio veriseeruminäytteessä. Tätä
tarkoitusta varten testipakkaus voi sisältää tarvittavien komponenttien, kuten vasta-
aineiden ja substraattien, erillisiä ampulleja tai säiliöitä käytettäväksi analyysin
30 määrittämiseen.

30



Viitteet

1. Boushey, C.J., Beresford, S.A.A., Omenn, G.S., Motulsky, A.G., JAMA 1995; 274:1049-57
- 5
2. Graham, I.M., Daly, L.E., Rafsum, H.M. *et al.*, The European Concerted Action Project, JAMA 1997; 277:1775-81
3. Jacobsen, O.W., Clin Chem 1998; 44:1833-43
- 10
4. Mogadashian, M. H., McManus, B.M., Frohlich, J.J., Arch Intern Med 1997; 157: 2299-2308
5. Rafsum, H., Ueland, P.M., Nygård, O., Vollset, S.E., Rev Medicine 1998; 49:31-62.
- 15



Patenttivaatimukset

1. Menetelmä verisuoni- ja syöpäsairaudelle riskialttiin yksilön identifioimiseksi, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa

5 - määritetään kvantitatiivisesti pepsinogeeni I:n (PGI) analyyttikonsentraatio mainitun yksilön seeruminäytteessä,

- määritetään menetelmäspesifinen cut-off-arvo mainitulle analyytille,

- verrataan näin määritettyä analyyttikonsentraatiota analyytin menetelmäspesifiseen cut-off-arvoon, ja

10 - määritetään homokysteiinikonsentraatio yksilön seeruminäytteessä ja verrataan sitä homokysteiinin menetelmäspesifiseen viitearvoon.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yksilön seeruminäytteestä määritetään PGI-konsentraatio ja sen jälkeen

15 homokysteiinikonsentraatio, kun seerumin PGI-konsentraatio on alle sen cut-off-arvon.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se sisältää myös vaiheen, jossa määritetään näytteen B12-vitamiinikonsentraatio ja verrataan sitä menetelmäspesifiseen viitearvoon.

20

4. Testipakkaus patenttivaatimuksen 1 mukaisen menetelmän suorittamiseksi, joka pakkaus sisältää

- välineet PGI-konsentraation määrittämiseksi seeruminäytteessä,

25

- välineet homokysteiinikonsentraation määrittämiseksi seeruminäytteessä.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen testipakkaus, jossa välineet pepsinogeeni I- ja homokysteiinikonsentraation määrittämiseksi ovat immunologisia välineitä.

30

Patentkrav

1. Förfarande för att identifiera en individ med risk för blodkärls- och cancersjukdom, **kännetecknat** därav, att förfarandet omfattar stegen, i vilka

- 5
- man bestämmer kvantitativt pepsinogen I (PGI) analytkoncentrationen från ett serumprov av nämnda individ,
 - man bestämmer ett metodspecifikt cut-off-värde för nämnda analyt,
 - man jämför den så bestämda analytkoncentrationen med analytens metodspecifika cut-off-värde, och
- 10
- man bestämmer homokysteinkoncentrationen i ett serumprov av individen och jämför den med ett metodspecifikt referensvärde för homokystein.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** därav, att man ur ett serumprov från individen bestämmer PGI-koncentrationen och därefter homokystein-

15

koncentrationen då serumets PGI-koncentrationen är under dess cut-off-värde.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, **kännetecknat** därav att det innehåller också ett steg där man bestämmer provets B12-vitaminkoncentration och jämför den med ett metodspecifikt referensvärde.

20

4. Testförpackning för att genomföra förfarandet enligt patentkravet 1, vilken förpackning innehåller

- medel för att bestämma PGI-koncentrationen i ett serumprov,
- medel för att bestämma homokysteinkoncentrationen i ett serumprov.

25

5. Testförpackning enligt patentkravet 4, i vilken medlen för att bestämma pepsinogen I och homokysteinkoncentrationen är immunologiska medel.

30